

东亚飞蝗 *fem-1* 基因的克隆与表达分析

时 红, 郝友进, 陈 斌, 司凤玲, 王 鹏, 何正波*

(重庆师范大学生命科学学院, 昆虫与分子生物学研究所, 重庆 400047)

摘要: 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans fem-1* 基因是性别决定的关键基因。本研究基于生物信息学方法从东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的转录组数据库中克隆出了线虫 *fem-1* 的 3 个同源基因, 将其分别命名为 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* (GenBank 登录号分别为 AB698670, AB698671 和 AB698672)。其 cDNA 序列长度分别为 2 233, 2 625 和 2 142 bp, 分别编码 662, 642 和 638 个氨基酸。生物信息学分析显示, *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 分别含有 6, 8 和 8 个典型的锚蛋白重复序列模体。组织表达谱分析发现, *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 基因在检测的所有组织中都有表达, 但均在精巢中的表达水平最高, 说明 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 基因可能参与东亚飞蝗的多种生理过程, 并受到严格的表达调控。而且, 随着精巢的发育, *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 的表达均逐渐增强, 可能与东亚飞蝗的精子形成有关, 但这 3 个基因是否参与东亚飞蝗的性别决定还有待进一步研究。

关键词: 东亚飞蝗; *fem-1* 基因; 同源体; 克隆; 生物信息学分析; 表达谱; 定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)07-0629-09

Cloning and expression analysis of *fem-1* genes from the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Locustidae)

SHI Hong, HAO You-Jin, CHEN Bin, SI Feng-Ling, WANG Peng, HE Zheng-Bo* (Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: The *fem-1* gene plays a key role in sex determination in *Caenorhabditis elegans*. In this study, three homologs of the *C. elegans fem-1* gene were cloned and characterized from a transcriptome database of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis*, based on bioinformatical analysis. They were named *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c*, with the Genbank accession numbers of AB698670, AB698671 and AB698672, respectively. The cDNAs of the three genes are 2 233, 2 625 and 2 142 bp in length, encoding proteins with 662, 642 and 638 amino acids, respectively. Bioinformatical analysis revealed that *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c* contain 6, 8 and 8 typical ankyrin repeat motifs, respectively. Gene expression analysis showed that *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c* were expressed in all tested tissues with significantly different transcript level, suggesting that *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c* are tightly regulated and might be involved in multiple physiological processes. *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c* had the highest expression level in testis, and their expression increased gradually with the development of testis. These findings strongly suggest that *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* and *Lmfem-1c* may be involved in the spermatogenesis of the locust. Further functional analysis is required to clarify the roles of these genes in sex determination in the locust.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*; *fem-1* gene; homologs; cloning; bioinformatical analysis; expression profile; quantitative real-time PCR

秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans fem-1* 基因是性别决定的关键基因之一 (Doniach and Hodgkin, 1984; Kimble *et al.*, 1984; Spence *et al.*, 1990), 突

变后 XO 型线虫可以由雄性逆转为雌雄同体 (Hodgkin and Brenner, 1977)。在种系细胞的发育过程中, *fem-1* 与雄性和雌雄同体线虫的精子发生

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (CSTC2012JJA80032); 重庆市教委科学技术研究项目 (KJ100617); “两江学者”计划专项经费资助项目
作者简介: 时红, 女, 1989 年生, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: shihonghong120@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhengbohe@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-03-28; 接受日期 Accepted: 2013-05-14

和发育有关(Doniach and Hodgkin, 1984; Hodgkin, 1987)。线虫*fem-1* 基因的转录产物长约 2.4 kb, 编码 656 个氨基酸的可溶性胞内蛋白, N 端有 6 个保守的锚蛋白重复序列模体(ankyrin repeat motif)(Spence *et al.*, 1990)。锚蛋白重复序列模体由约 33 个氨基酸残基组成, 广泛存在于多种蛋白质中, 参与信号转导和转录调控(Lambert *et al.*, 1990; Spence *et al.*, 1990)。在线虫的性别决定调控通路中,*fem-1* 与*fem-2* 和*fem-3* 一起负调控*tra-1* 基因的表达(Doniach and Hodgkin, 1984; Kimble *et al.*, 1984; Hodgkin, 1987; Starostina *et al.*, 2007)。*tra-1* 基因编码一个 DNA 序列特异性结合的转录因子, 处于调控通路的终端, 在线虫的性别决定中具有决定性的作用(Hunter and Wood, 1990; Zarkower and Hodgkin, 1992, 1993)。

除线虫*fem-1* 基因外, 从昆虫到高等的哺乳动物都有线虫*fem-1* 基因的同源基因, 而且大多数物种含 3 个同源基因, 形成*fem-1* 基因家族。例如, 人有*fem-1a*, *fem-1b* 和*fem-1c* 等 3 个基因(Ventura-Holman and Maher, 2000; Krakow *et al.*, 2001; Ventura-Holman *et al.*, 2003), 小鼠也同样有*fem-1a*, *fem-1b* 和*fem-1c* 等基因(Ventura-Holman *et al.*, 1998; Ventura-Holman *et al.*, 2003)。将 β Geo 基因fem-1c 基因的第一个内含子中, 导致*fem-1c* 表达下降, 产下的雌性幼崽的数量并没有明显增加, 说明*fem-1c* 与小鼠的性别决定没有关系(Schlam Pet *al.*, 2004)。其他基因的功能尚无研究报道, 是否与性别决定有关也还不清楚。

在多种昆虫中也都克隆出了线虫*fem-1* 的同源基因, 但这些基因的功能尚无研究报道。东亚飞蝗*Locusta migratoria manilensis* (Meyen)是我国最重要的农业害虫之一, 常暴发式为害, 造成巨大的经济损失。同时, 东亚飞蝗也是直翅目昆虫的模式物种(Kang *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006)。性别决定与分化是影响东亚飞蝗生殖、发育和种群结构的关键因素, 但迄今为止东亚飞蝗性别决定的分子机制还没有人研究。本研究通过分析东亚飞蝗胚胎时期的转录组数据库(未发表), 克隆到 3 个线虫*fem-1* 基因的同源基因, 分别命名为*Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和*Lmfem-1c*, 并采用实时荧光定量 PCR 方法研究了这 3 个基因在东亚飞蝗不同组织中的表达情况, 为进一步解析*Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和*Lmfem-1c* 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

东亚飞蝗*L. migratoria manilensis* (Meyen)为室内饲养种群, 饲养的温度 30℃ 左右, 相对湿度为 60%~75%, 光照周期 12L: 12D, 饲喂新鲜小麦或玉米苗(He *et al.*, 2006)。

1.2 主要试剂

TRIzol、DNase I (RNase Free)、LA Taq 酶、pMD19-T 载体和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购于 TaKaRa 公司, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 Fermentas 公司, QIAquick PCR Purification Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 购于 Qiagen 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 东亚飞蝗*fem-1* 基因的克隆和分析

以*fem-1* 为关键词搜索东亚飞蝗胚胎时期的转录组数据库(未发表)的注释信息, 获得了 3 个 Unigenes: Unigene4693, Unigene43753 和 Unigene44715, 长度分别为 2 625, 2 142 和 2 233 bp。用 BLASTX 算法进行在线比对以进一步确认。用 ORF finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测编码序列, 发现每个 Unigene 均有一个完整的开放阅读框。根据 Unigene 的序列设计特异引物(包含完整的开放阅读框)(表 1), 以东亚飞蝗胚胎的 cDNA 为模板, 用 LA Taq 酶进行 PCR 扩增, PCR 产物送上海生工测序。

序列的相似性比较采用 Blast2.1 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>); 理论分子量和等电点预测采用 ProtParam and Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/); 多序列的比较分析采用 Clustal W 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)(Thompson *et al.*, 1997); 蛋白质的结构与特征预测采用 ScanProsite 软件(<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)(de Castro *et al.*, 2006)。信号肽分析使用 SignalP 4.1 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)(Petersen *et al.*, 2011); 跨膜结构分析采用 TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 和 TMHMM Server v. 2.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。利用 MEGA4.0 软件程序, 运用邻近连接方法(Neighbor-joining, NJ)建立系统发育树, 分支节点支持率采用 1 000 次重复抽样进行氨基酸序列聚类分析(Tamura *et al.*, 2007)。

表 1 在 cDNA 克隆和数量 PCR 中使用的基因引物

Table 1 Primer sequences used in the cDNA cloning and quantitative real-time PCR

目的基因 Target gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	用途 Purpose
<i>Lmfem-1a</i>	AGCCATTTCTTATGCTGAGCAG	<i>Lmfem-1a</i> 基因 cDNA 克隆
	GTCAAAATGGATCATGTCAAGC	<i>Lmfem-1a</i> cDNA cloning
<i>Lmfem-1b</i>	TTTGGA CTCAAATTAGAACGTT	<i>Lmfem-1b</i> 基因 cDNA 克隆
	GAACATCATTTATGTCATCCCT	<i>Lmfem-1b</i> cDNA cloning
<i>Lmfem-1c</i>	TGCTGTGGAGTATGTCGGAAGA	<i>Lmfem-1c</i> 基因 cDNA 克隆
	CCTCAATCTTAATGACGTGCAAC	<i>Lmfem-1c</i> cDNA cloning
<i>Lmfem-1a</i>	CGCAGATGTGGAACAGAAA	<i>Lmfem-1a</i> 基因定量 PCR
	ACAGGAAGACGACCACTAA	<i>Lmfem-1a</i> real-time PCR
<i>Lmfem-1b</i>	AGCCATTCAAAATAACCAA	<i>Lmfem-1b</i> 基因定量 PCR
	CCCACGGAAGATAACAGGA	<i>Lmfem-1b</i> real-time PCR
<i>Lmfem-1c</i>	AAATACGTCCAACACTTCTTCAA	<i>Lmfem-1c</i> 基因定量 PCR
	TTCGCTGTCGTCATTTGCT	<i>Lmfem-1c</i> real-time PCR
<i>armadillo</i>	AGCATTCAGGATACACAGAGAC	<i>armadillo</i> 基因定量 PCR
	GCAGGGCTCCAACAGTTCC	<i>armadillo</i> real-time PCR

1.4 东亚飞蝗 *fem-1* 基因在不同组织中的表达模式

解剖羽化后 1 d 成虫的 8 个不同组织部位, 包括头、中肠、卵巢、精巢、脂肪体、体壁、早期胚胎、中期胚胎和晚期胚胎。除精巢、卵巢和胚胎外, 其余样品均为雌、雄虫相应组织的混合样品。雌雄虫各 3 头为 1 个生物学重复, 各组织设 3 个重复, 存于液氮中备用。

用 Trizol 试剂提取总 RNA, DNase I (RNase Free) 酶解残存的 DNA, RNA 电泳与定量检测后, 参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书以 2 μg 的总 RNA 为模板进行 cDNA 的合成。

根据东亚飞蝗 *fem-1* 基因的 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物, 以 *armadillo* 基因为内参, 引物见表 1。采用 SYBR® Premix Ex Taq™ 染料, 使用 Eppendorf 的 Mastercycler e Prealplex 4 荧光定量 PCR 仪进行定量分析。PCR 扩增反应总体积为 20 μL, 包括 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, 10 μmol/L 正反向引物各 0.4 μL, 模板 cDNA 0.8 μL, 超纯水 8.4 μL。扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。重复 3 次, 使用 2^{-ΔΔC_T} 法计算东亚飞蝗 *fem-1* 基因在不同组织的表达情况。

1.5 东亚飞蝗 *fem-1* 基因在精巢发育过程中的表达模式

取 5 龄雄若虫、羽化后 3, 6, 12 和 24 d 的雄成虫各 5 头, 解剖出精巢。若虫为 5 龄不同时间的混合样品。总 RNA 的提取、cDNA 制备和定量 PCR 方法同 1.4 节。

1.6 数据统计与分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 统计数据以平均数 ± 标准差表示。组间差异采用单因素方差 (one way ANOVA) 分析, 两组比较采用 Student *t*-test 进行分析。P < 0.05 代表差异显著, P < 0.01 代表差异极显著。

2 结果

2.1 东亚飞蝗 *fem-1* 基因的克隆

以 *fem-1* 为关键词搜索东亚飞蝗胚胎时期的转录组数据库 (未发表) 的注释信息, 得到 3 个 Unigenes: Unigene4693, Unigene43753 和 Unigene44715, 长度分别为 2 625, 2 142 和 2 233 bp, 各有一个完整的开放阅读框。根据 Unigenes 设计特异性引物 (表 1), 分别扩增 3 个 Unigenes 的开放阅读框, 测序后获得的序列与转录组数据库中鉴定出的 Unigenes 的相应序列完全一致。在 NCBI 上在线比对后发现, 这 3 个 Unigenes 编码的氨基酸序列与其他物种的 Fem-1 具有较高的同源性, 且具有

特征性的锚蛋白重复序列模体,说明这 3 个 Unigenes 是东亚飞蝗的 *fem-1* 基因。根据同源性将这 3 个基因分别命名为 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c*, 将序列登录到 GenBank, 登录号分别为 AB698670, AB698671 和 AB698672。

2.2 *Lmfem-1* 基因的序列分析

Lmfem-1a, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 基因的序列特点见表 2。BLAST 分析发现 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 之间的同源性较低, *Lmfem-1a* 与 *Lmfem-1b*, *Lmfem-1a* 与 *Lmfem-1c* 以及 *Lmfem-1b* 与 *Lmfem-1c* 之间的氨基酸序列一致性分别为 25.55%, 32.20% 和 35.40%, 但与其他物种相应基因的同源性较高。例如, *Lmfem-1a* 与丽蝇蛹集金小蜂 *Fem-1* (GenBank 登录号: XP_001606383) 的氨

基酸序列一致性最高, 达 66.21%, 与人体虱 *Fem-1* (GenBank 登录号: XP_002426405) 和赤拟谷盗 *Fem-1* (GenBank 登录号: XP_967114) 的氨基酸序列一致性分别为 65.12% 和 58.47%; *Lmfem-1b* 与赤拟谷盗 *Fem-1b* (XP_975561) 的氨基酸序列一致性最高, 为 70.10%, 与人 *Fem-1b* (GenBank 登录号: NM_015322) 的氨基酸序列一致性为 53.43%; *Lmfem-1c* 与赤拟谷盗 *Fem-1* (GenBank 登录号: XM_001811644) 的氨基酸序列一致性最高, 为 63.96%, 与人 *Fem-1c* (GenBank 登录号: NM_020177) 的氨基酸序列一致性为 53.21%。*Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 与线虫 *Fem-1* 的氨基酸序列一致性分别为 25.04%, 26.91% 和 34.74%。

表 2 东亚飞蝗 *fem-1* 基因的序列特点

Table 2 Characteristics of *fem-1* from *Locusta migratoria manilensis*

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.	cDNA 长度 (bp) cDNA size	开放阅读框 ORF	氨基酸长度 Amino acid size	分子量 (kDa) Molecular weight	等电点 pI
<i>Lmfem-1a</i>	AB698670	2 233	214 - 2 202	662	75.16	6.81
<i>Lmfem-1b</i>	AB698671	2 625	229 - 2 157	642	71.63	5.82
<i>Lmfem-1c</i>	AB698672	2 142	137 - 2 071	638	69.66	6.67

将东亚飞蝗 *Fem-1* 与分属于双翅目、半翅目、膜翅目、鞘翅目、鳞翅目等昆虫以及人、鼠等脊椎动物的 *Fem-1* 蛋白序列进行比对, 并用 NJ 法绘制了分子系统发育树, 利用自举分析 (Bootstrap, 1 000 次重复) 检验各分支的置信度。由进化树可以发现: *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 分别与其他物种的 *Fem-1a*, *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 聚到一起, 形成明显的三支。*Lmfem-1a* 与人体虱 *Fem-1* (GenBank 登录号: XP_002426405) 的亲缘关系最近, *Lmfem-1b* 与丽蝇蛹集金小蜂 *Fem-1b* (GenBank 登录号: NP_001153369) 和赤拟谷盗 *Fem-1b* (GenBank 登录号: XP_975561) 的亲缘关系最近, *Lmfem-1c* 与赤拟谷盗 *Fem-1* (GenBank 登录号: XM_001811644) 的亲缘关系最近 (图 1), 与同源性比对结果一致。

ScanProsite 功能序列分析结果表明, *Lmfem-1a* 有 6 个锚蛋白重复序列模体, 而 *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 分别有 8 个锚蛋白重复序列模体 (表 3)。*Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 均无信号肽序列, 也无跨膜结构域, 属于细胞内在蛋白质。

2.3 *Lmfem-1* 基因在不同组织的表达分析

运用荧光定量 PCR 方法对 *Lmfem-1* 基因在 1 日龄成虫的头、中肠、精巢、卵巢、脂肪体和体壁, 以及早期胚胎、中期胚胎和晚期胚胎等组织部位的表达情况进行分析。结果表明 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 在所检测的组织中均有表达, 但表达水平有较大的变异 (图 2)。

Lmfem-1a 基因在精巢中表达水平最高 ($F = 80.993$, $P = 0.0001$), 其次是头部、卵巢和中肠, 但三者之间的表达水平差异不明显 ($F = 4.0650$, $P = 0.0766$)。早期胚胎中的表达水平与体壁、脂肪体中的表达水平基本一样, 但随着胚胎的发育, *Lmfem-1a* 的表达水平逐渐降低, 到晚期胚胎时表达量最低 (图 2: A)。*Lmfem-1b* 在精巢中的表达水平显著高于其他组织, 而在精巢外所有检测的组织中表达水平均没有明显的差异 ($F = 112.9470$, $P = 0.0001$) (图 2: B)。*Lmfem-1c* 与 *Lmfem-1b* 一样, 在精巢中的表达水平最高, 而其他检测的组织中的表达水平也无明显差异 ($F = 48.6290$, $P = 0.0001$) (图 2: C)。

表 3 东亚飞蝗 Fem-1 锚蛋白重复序列模体分析
Table 3 The analysis of ankyrin repeat motifs of Fem-1 from *Locusta migratoria manilensis*

蛋白质 Protein	GenBank 登录号 GenBank accession no.	序号 No.	起始位置 Start	终止位置 End	得分 Score
Lmfem-1a	AB698670	1	69	90	8.63
		2	112	144	10.953
		3	145	177	10.125
		4	209	241	12.102
		5	551	570	7.481 *
		6	570	605	10.205
Lmfem-1b	AB698671	1	50	73	7.561 *
		2	92	124	11.06
		3	125	157	10.98
		4	158	190	11.14
		5	191	223	12.022
		6	223	244	7.534 *
		7	491	538	6.653 *
		8	539	579	6.653 *
Lmfem-1c	AB698672	1	40	63	8.576
		2	82	114	10.873
		3	115	147	12.85
		4	148	180	10.072
		5	181	213	12.422
		6	213	235	8.256 *
		7	496	544	7.534 *
		8	545	581	11.327

* 较低的置信水平 With low confidence level.

达水平无明显差异 ($F = 3.358$, $P = 0.1051$), 直到第 12 天时表达水平才显著增高, 然后趋于稳定 ($t_{A12-A24} = 1.0658$, $P = 0.3466$) (图 3: A); *Lmfem-1b* 的增长趋势与 *Lmfem-1a* 一样, 虽然第 24 天的表达水平低于第 12 天, 但差异不明显 ($t_{A12-A24} = 0.4843$, $P = 0.6753$) (图 3: B); *Lmfem-1c* 的表达增长较为迅速, 羽化后第 6 天已显著高于 5 龄若虫 ($t_{N5-A6} = 4.8867$, $P = 0.0081$), 第 6 天后表达水平无明显的差异 ($F = 1.3770$, $P = 0.3220$) (图 3: C)。

3 讨论

性别决定是两性生物发育过程中的重要事件, 也是生物体最基本的生命特征 (Sánchez, 2008)。果蝇的性别决定是由 *sex*, *tra*, *tra-2* 和 *dsx* 等基因形成

的级联调控通路决定的 (Salz, 2011)。X 染色体与常染色体套数的比值 (X:A) 是这一通路的初始遗传信号, 位于调控通路最顶端的 *sex* 基因是 X:A 信号的作用靶标 (Bell *et al.*, 1988)。尽管秀丽隐杆线虫性别决定的初始遗传信号也为 X:A 的比值, 但性别决定机制与果蝇相比具有较大的差异, 其性别决定的调控通路由 *her-1*, *tra-2*, *tra-3*, *fem-1*, *fem-2*, *fem-3* 和 *tra-1* 等基因组成, 从 *her-1* 到 *tra-1* 经过一系列的负调控, 最终由 *tra-1* 基因引导其性别分化 (Hodgkin, 1987; Villeneuve and Meyer, 1990)。迄今为止, 东亚飞蝗性别决定的分子机制尚无研究报道。蝗虫的性染色体为 XO 型, 果蝇为 XY 型, 而线虫属于 XO 型。一般认为昆虫的 XO 型是在进化过程中丢失 Y 染色体而形成的, 比如 XO 型果蝇是雄虫, XO 型蝗虫也是雄虫, 然而蝗虫性别决定的分

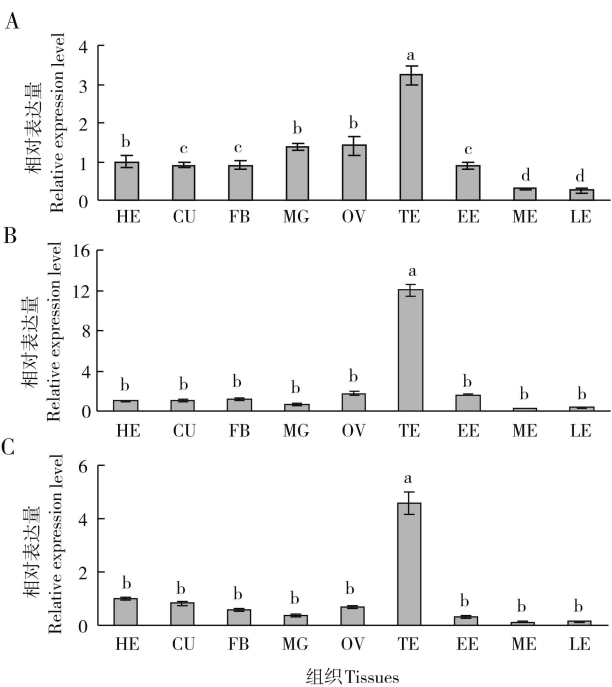


图2 东亚飞蝗 *fem-1* 基因在 1 日龄成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *fem-1* genes in different tissues of 1-day-olds of *Locusta migratoria manilensis*

A: *Lmfem-1a*; B: *Lmfem-1b*; C: *Lmfem-1c*. HE: 头部 Head; CU: 体壁 Cuticle; FB: 脂肪体 Fat body; MG: 中肠 Midgut; OV: 卵巢 Ovary; TE: 精巢 Testis; EE: 早期胚胎 Early embryo; ME: 中期胚胎 Mid embryo; LE: 晚期胚胎 Late embryo. 以 *armadillo* 基因作为内参; 柱上字母示不同组织表达量存在显著差异 ($P < 0.05$) (单因素方差分析). *armadillo* was used as the endogenous control. Different letters above bars indicate significant difference in expression level among different tissues detected with ANOVA analysis ($P < 0.05$).

子机制是否与果蝇一样还有待研究。作者从东亚飞蝗的转录组数据库中鉴定出了 *sxl*, *tra* 和 *tra-2* 等果蝇性别决定的同源基因, 而仅鉴定出了线虫 *fem-1* 的 3 个同源基因, 说明东亚飞蝗的性别决定机制可能更接近于果蝇。因而, 深入研究这些基因的功能将有助于阐明东亚飞蝗的性别决定机制。

Lmfem-1a, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 的 cDNA 序列长度分别为 2 233, 2 625 和 2 142 bp, 分别编码 662, 642 和 638 个氨基酸。 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 相互之间的相似性很低, 却与其他物种 *fem-1* 有较高的相似性。系统发育分析发现东亚飞蝗 *Fem-1* 家族的 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 分别与其他物种的 *Fem-1a*, *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 聚到一起, 形成明显的三支 (图 1), 说明 *Fem-1* 家族的 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 可能具有不同的

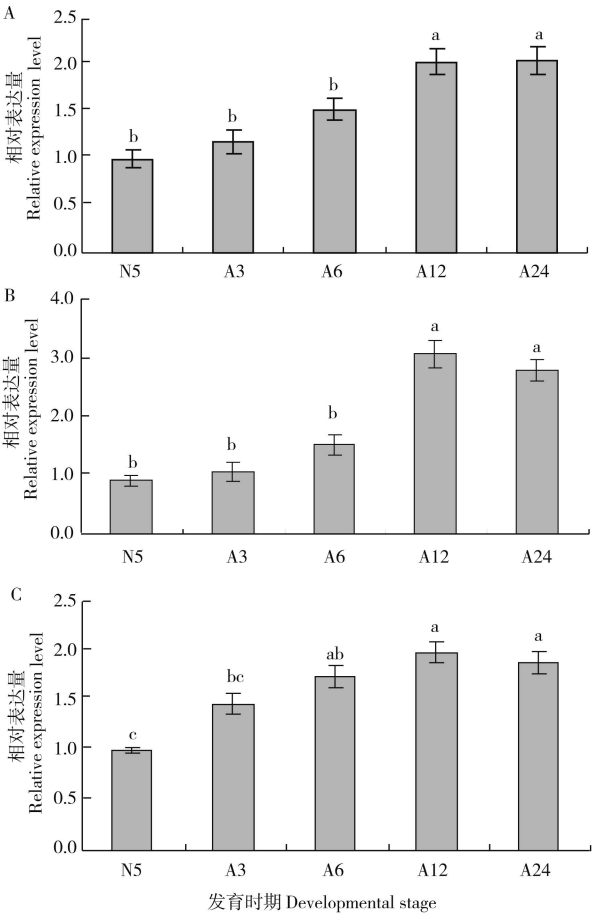


图3 东亚飞蝗 *fem-1* 基因在不同发育时期雄虫精巢中的表达情况

Fig. 3 Relative expression levels of *fem-1* genes in testis at different developmental stages of male *Locusta migratoria manilensis*

A: *Lmfem-1a*; B: *Lmfem-1b*; C: *Lmfem-1c*. N5: 5 龄若虫 5th instar nymph; A3: 3 日龄成虫 3-day-old adult; A6: 6 日龄成虫 6-day-old adult; A12: 12 日龄成虫 12-day-old adult; A24: 24 日龄成虫 24-day-old adult. *armadillo* 基因作为内参; 柱上字母示不同发育阶段的表达量存在显著差异 ($P < 0.05$) (单因素方差分析). *armadillo* was used as the endogenous control. Different letters above bars indicate significant difference in expression level among different stages detected with ANOVA analysis ($P < 0.05$).

演化过程, 参与不同的生理活动。将东亚飞蝗 *Fem-1* 与线虫、人和鼠等物种的 *Fem-1* 进行保守功能区和位点对比分析, 鉴定出 *Lmfem-1a*, *Lmfem-1b* 和 *Lmfem-1c* 分别有 6, 8 和 8 个锚蛋白重复序列模体 (表 3)。线虫 *Fem-1* 有 6 个锚蛋白重复序列模体 (Doniach and Hodgkin, 1984; Spence *et al.*, 1990), 人、鼠和斑马鱼等物种的 *Fem-1a*, *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 有 6 ~ 8 个锚蛋白重复序列模体 (Ventura-Holman and Maher, 2000; Krakow *et al.*, 2001; Ventura-Holman *et al.*, 2003)。除 *Fem-1* 外, Notch、GABPb、

细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p19, cdc10/SW16, lin12 和 glp-1 等也有锚蛋白重复序列模体, 这些蛋白都与信号转导或转录调控有关 (Berry *et al.*, 1997; Weinmaster, 2000; Petcherski and Kimble, 2000)。因此, *Lmfem-1* 基因也可能与信号转导或转录调控有关。

在线虫中, *fem-1* 基因在各个发育时期和不同组织中均有表达 (Gaudet *et al.*, 1996)。在种系细胞的发育过程中, *fem-1* 与雄性和雌雄同体线虫的精子发生和发育有关 (Doniach and Hodgkin, 1984; Hodgkin, 1987)。人 *fem-1a* 在心肌组织和肾脏中表达水平高 (Krakow *et al.*, 2001), 而 *fem-1b* 和 *fem-1c* 均在精巢中高表达, 与精子的形成有关 (Ventura-Holman and Maher, 2000; Ventura-Holman *et al.*, 2003)。*Lmfem-1* 基因在检测的所有组织中都有表达, 但在精巢中的表达水平最高 (图 2), 说明 *Lmfem-1* 基因可能参与东亚飞蝗的多种生理过程, 并受到严格的表达调控。在精巢的发育过程中, *Lmfem-1* 的表达逐渐增强, 并能维持在较高水平持续表达较长的时间 (图 3)。在本实验室的人工饲养条件下, 东亚飞蝗羽化后 6–7 d 开始交配, 12 d 左右开始陆续产卵, 而且蝗虫一生要经过多次交配。由此可见, 伴随着精子的发生和成熟, *fem-1* 的表达逐渐增强, 可能在东亚飞蝗精子发生过程中具有重要的作用。*fem-1* 基因在人、蝗虫和线虫中都与精子的发生有关, 说明 *fem-1* 基因的这部分功能较为保守。但 *fem-1* 基因在线虫中又是性别决定的关键基因之一, 与 *fem-2* 和 *fem-3* 一起负调控 *tra-1* 的表达 (Doniach and Hodgkin, 1984; Hodgkin, 1987)。然而小鼠 *fem-1c* 基因与性别决定无关 (Schlam Pet *al.*, 2004), 说明 *fem-1* 基因的性别决定作用是不保守的。在东亚飞蝗中, *fem-1* 基因是否与性别决定有关还有待进一步研究。更有意思的是, 东亚飞蝗 *fem-1* 基因家族的 3 个基因均在精巢中高表达, 而且表达水平的变化模式非常相似, 因而这 3 个基因的功能是否相同以及相互之间的作用关系也还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Bell LR, Maine EM, Schedl P, Cline TW, 1988. *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similar to RNA binding proteins. *Cell*, 55: 1037–1046.
- Berry LW, Westlund B, Schedl T, 1997. Germ-line tumor formation caused by activation of *glp-1*, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development*, 124: 925–936.
- de Castro E, Sigris CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N, 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucl. Acids Res.*, 34: W362–W365.
- Doniach T, Hodgkin J, 1984. A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 106: 223–235.
- Gaudet J, VanderElst I, Spence AM, 1996. Post-transcriptional regulation of sex determination in *Caenorhabditis elegans*: widespread expression of the sex-determining gene *fem-1* in both sexes. *Mol. Biol. Cell*, 7: 1107–1121.
- He ZB, Cao YQ, Yin YP, Wang ZK, Chen B, Peng GX, Xia YX, 2006. Role of *hunchback* in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Dev. Growth Differ.*, 48: 439–445.
- Hodgkin J, 1987. Sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Genet.*, 21: 133–154.
- Hodgkin JA, Brenner S, 1977. Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 86: 275–287.
- Hunter CP, Wood WB, 1990. The *tra-1* gene determines sexual phenotype cell-autonomously in *C. elegans*. *Cell*, 63: 1193–1204.
- Kang L, Chen XY, Zhou Y, Liu BW, Zheng W, Li RQ, Wang J, Yu J, 2004. The analysis of large-scale gene expression correlated to the phase changes of the migratory locust. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 17611–17615.
- Kimble J, Edgar L, Hirsh D, 1984. Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the *fem* genes. *Dev. Biol.*, 105: 234–239.
- Krakow D, Sebald E, King LM, Cohn DH, 2001. Identification of human *FEM1A*, the ortholog of a *C. elegans* sex-differentiation gene. *Gene*, 279: 213–219.
- Lambert S, Yu H, Prochal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, Cheung MC, Kan YW, Palek J, 1990. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1730–1734.
- Ma ZY, Yu J, Kang L, 2006. LocustDB: a relational database for the transcriptome and biology of the migratory locust (*Locusta migratoria*). *BMC Genomics*, 7: 11.
- Petcherski AG, Kimble J, 2000. LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature*, 405: 364–368.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H, 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8: 785–786.
- Sánchez L, 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 837–856.
- Salz HK, 2011. Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21: 395–400.
- Schlam CL, Thliveris AT, Li Y, Kohl LP, Knop C, Dietz JA, Larsen IV, Imesch P, Pinto LH, Nickells RW, 2004. Insertion of the beta Geo promoter trap into the *Fem1c* gene of ROSA3 mice. *Mol. Cell Biol.*, 24(9): 3794–3803.

- Spence AM, Coulson A, Hodgkin J, 1990. The product of *fem-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell*, 60: 981–990.
- Starostina NG, Lim JM, Schvarzstein M, Wells L, Spence AM, Kipreos ET, 2007. A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. *Dev. Cell*, 13(1): 127–139.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596–1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 25: 4876–4882.
- Ventura-Holman T, Lu D, Si X, Izevbigie EB, Maher JF, 2003. The *Fem1c* genes: conserved members of the *Fem1* gene family in vertebrates. *Gene*, 314: 133–139.
- Ventura-Holman T, Maher JF, 2000. Sequence, organization, and expression of the human *FEM1B* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267: 317–320.
- Ventura-Holman T, Seldin MF, Li W, Maher JF, 1998. The murine *fem1* gene family: homologs of the *Caenorhabditis elegans* sex-determination protein FEM-1. *Genomics*, 54(2): 221–230.
- Villeneuve AM, Meyer BJ, 1990. The regulatory hierarchy controlling sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Genet.*, 27: 117–188.
- Weinmaster G, 2000. Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10: 363–369.
- Zarkower D, Hodgkin J, 1992. Molecular analysis of the *C. elegans* sex-determining gene *tra-1*: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell*, 70: 237–249.
- Zarkower D, Hodgkin J, 1993. Zinc fingers in sex determination: only one of the two *C. elegans* Tra-1 proteins binds DNA in vitro. *Nucl. Acids Res.*, 21(16): 3691–3698.

(责任编辑: 赵利辉)